

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

Doc. JS

|  |           |   |
|--|-----------|---|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b><br><b>C07H 21/00</b>  | <b>A2</b> | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 00/49031</b><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 24. August 2000 (24.08.00)  |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP00/01028<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 9. Februar 2000 (09.02.00)<br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>199 07 023.7 19. Februar 1999 (19.02.99) DE<br><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).<br><b>(72) Erfinder; und</b><br><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> PODSZUN, Wolfgang [DE/DE]; Roggendorfstrasse 55, D-51061 Köln (DE). NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Olefstrasse 11, D-50937 Köln (DE).  |           | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> |
| <b>(54) Title:</b> METHOD FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS<br><b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUCLEINSÄUREN<br><b>(57) Abstract</b><br>Nucleic acids can be efficiently adsorbed on specific water-insoluble pearl polymers with an average size of 3 to 100 $\mu$ m, at a neutral or acidic pH value. The acids can then be liberated at an alkaline pH with high yields.<br><b>(57) Zusammenfassung</b><br>Nucleinsäuren können bei neutralem und saurem pH-Wert an speziellen wasserunlöslichen Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 $\mu$ m effizient adsorbiert werden und bei basischen pH-Werten in hoher Ausbeute wieder freigesetzt werden. |           |   |

LeA 33 254

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                   |    |   |    |                                |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                           | LS | Lesotho   | SI | Slowenien                      |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                          | LT | Litauen   | SK | Slowakei                       |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                        | LU | Luxemburg                                       | SN | Senegal                        |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                             | LV | Lettland  | SZ | Swasiland                      |
| AZ | Aserbaidshjan                | GB | Vereinigtes Königreich            | MC | Monaco  | TD | Tschad                         |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                          | MD | Republik Moldau                                 | TG | Togo                           |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                             | MG | Madagaskar                                      | TJ | Tadschikistan                  |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                            | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                   |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                      |    |   | TR | Türkei                         |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                            | ML | Mali  | TT | Trinidad und Tobago            |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                            | MN | Mongolei  | UA | Ukraine                        |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                            | MR | Mauretanien                                     | UG | Uganda                         |
| BY | Belarus                      | IS | Island                            | MW | Malawi  | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                           | MX | Mexiko  | UZ | Usbekistan                     |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                             | NE | Niger   | VN | Vietnam                        |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                             | NL | Niederlande                                     | YU | Jugoslawien                    |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                       | NO | Norwegen  | ZW | Zimbabwe                       |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | NZ | Neuseeland                                      |    |                                |
| CM | Kamerun                      |    |                                   | PL | Polen   |    |                                |
| CN | China                        | KR | Republik Korea                    | PT | Portugal  |    |                                |
| CU | Kuba                         | KZ | Kasachstan                        | RO | Rumänien  |    |                                |
| CZ | Tschechische Republik        | LC | St. Lucia                         | RU | Russische Föderation                            |    |                                |
| DE | Deutschland                  | LI | Liechtenstein                     | SD | Sudan   |    |                                |
| DK | Dänemark                     | LK | Sri Lanka                         | SE | Schweden  |    |                                |
| EE | Estland                      | LR | Litauen                           | SG | Singapur  |    |                                |

Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Abtrennen und selektiven Freisetzen von Nucleinsäuren unter Verwendung spezieller Perlpolymerisate.

In jüngster Zeit gewinnt die sogenannte Gen-Diagnostik zunehmend an Bedeutung. Die Gen-Diagnostik hat Eingang gefunden in die Diagnostik humaner Erkrankungen (u.a. Nachweis von Infektionserregern, Nachweis von Mutationen des Genoms, Analyse von zirkulierenden Tumorzellen und Identifizierung von Risikofaktoren für die Prädisposition einer Erkrankung). Aber auch in der Veterinärmedizin, der Umweltanalytik und Nahrungsmitteltestung findet die Gen-Diagnostik mittlerweile ihre Anwendung. Ein weiteres Anwendungsgebiet stellen Untersuchungen an Pathologischen-/Zytologischen Instituten oder im Rahmen forensischer Fragestellungen dar. Aber auch im Rahmen der Qualitäts- und Prozesskontrolle (beispielsweise Untersuchungen von Blutproben auf Infektionserreger-Freiheit) wird die Gen-Diagnostik mittlerweile eingesetzt und der Gesetzgeber plant, die Zahl der heute schon vorgeschriebenen Tests per Gesetz in Zukunft zu erweitern.

Methoden, die bei der Gen-Diagnostik zum Einsatz kommen (wie z.B. Hybridisierungs- oder Amplifikationstechniken wie die PCR, bDNA oder NASBA, TMA Technologie) gehören auch bei wissenschaftlichen Grundlagenarbeiten zu den Routineverfahren.

Durch die zunehmende Verbreitung nicht-radioaktiver Detektionsverfahren, die auch im Rahmen der Gen-Diagnostik eine Rolle spielen, ist zu erwarten, daß die Gen-Diagnostik in Zukunft noch weitere Verbreitung als zur Zeit finden wird.

Bei der Gen-Diagnostik ist die Gewinnung von Gen-Proben aus biologischem Material wie Zellen, Blut, Sputum, Liquor, Serum oder Urin ein wichtiger Teilschritt.

Die Bindung von Nucleinsäuren an polyquaternäre kationische Polymere ist aus der US-A-4 046 750 bekannt. Allerdings ist die Bindung irreversibel, so daß bei dieser Methode die adsorbierten Nucleinsäuren nicht wieder freigesetzt werden können.

- 5 Die US-A-4 055 469 offenbart eine Methode zur Reinigung von Enzymen, wobei Nucleinsäuren und unerwünschte Proteine mit Hilfe wasserlöslicher kationischer Polymere ausgefällt werden.

- 10 Aus der US-A-4 839 231 sind mit Vinylpyridinpolymer beschichtete Träger bekannt, die Proteine und Nucleinsäuren adsorbieren können. Allerdings ist die Kapazität der Träger recht niedrig und die Adsorption der Nucleinsäuren nicht quantitativ.

- 15 Die WO-A-91/05606 beschreibt ein silanisiertes, poröses Trägermaterial mit Hydroxyalkylaminogruppen für die chromatographische Trennung von Nucleinsäuren. Dieses Material ist jedoch zum schnellen und möglichst quantitativen Abtrennen von Nucleinsäuren aus biologischem Material weniger gut geeignet.

- 20 In der DE-A-4 139 664 wird eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren mit Hilfe von Anionenaustauschern beschrieben. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, daß die Desorption der Nucleinsäuren vom Anionenaustauscher nur mit Pufferlösungen hoher Ionenstärke gelingt und die Abtrennung der Salze aus der Pufferlösung zusätzliche Präparationsschritte erfordert.

- 25 Die DE-A-4 333 805 beansprucht die Extraktion von Nucleinsäuren aus einer Probe mit Hilfe von wasserlöslichen Trägern wie Dextran, Acrylamid oder Carboxymethylcellulose und weiteren Reagenzien, wobei die Nucleinsäuren ausgefällt werden.

- 30 In der EP-A-0 707 077 (entspricht der US-A-5 582 988) wird eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren aus biologischem Material unter Verwendung von löslichem, schwach basischem Polymer beschrieben. Bei dieser Methode wird in einem sauren pH-Bereich ein Fällungsprodukt aus dem löslichen, schwach basischen

Polymer und der Nucleinsäure erzeugt, das Fällungsprodukt von den nicht gefällten Bestandteilen des biologischen Materials abgetrennt und gewaschen und die Nucleinsäure aus dem Fällungsprodukt durch Einstellung eines basischen pH-Wertes wieder freigesetzt.

5

Ein Nachteil der Methoden nach DE-A-4 333 805 und EP-A-0 707 077 besteht darin, daß die Handhabung, insbesondere die Abtrennung und Reinigung des Fällungsproduktes schwierig und sehr zeitaufwendig ist. Diese Methoden lassen sich auch nicht bzw. nur unter erschwerten Bedingungen mit Hilfe automatisierter Analysegeräte ausführen.

10

Die WO-A-96/18731 beschreibt eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren mit Hilfe eines Detergenz und eines festen Trägers. Da feste Träger ohne Poren und ohne Quellbarkeit eingesetzt werden, ist die Bindungskapazität der Träger relativ gering.

15

In der WO-A-97/08547 wird eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren beschrieben, bei der die Nucleinsäuren an einem festen hydrophilen organischen Polymer ohne effektive positive Ladung, beispielsweise an Cellulose, gebunden werden. Bei dieser Methode erfolgt die Bindung über schwache Kräfte, wie Van der Waals Wechselwirkungen.

20

Die WO-A-97/34909 beschreibt eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren unter Verwendung eines speziellen teilchenförmigen Polymerisates mit einer unteren kritischen Löslichkeitstemperatur (lower critical solubility temperature, LCST) von 25-45 °C. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, daß zur Freisetzung der Nucleinsäuren Puffer mit hohen Ionenstärken, die bei der weiteren Verwendung der Nucleinsäuren stören können, angewendet werden müssen. Wegen der geringen Größe der verwendeten Partikel von 0,05 bis 2 µm ist zudem die Verarbeitung zeitaufwendig und schwierig zu automatisieren.

25

30

Trotz der zahlreichen vorbeschriebenen Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren besteht noch immer ein dringender Bedarf für eine einfache, möglichst automatisierbare Methode zur effektiven Abtrennung und Wiederfreisetzung von Nucleinsäuren aus biologischem Material.

5

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß bestimmte in Wasser unlösliche Perlpolymerisate polymerisierter Einheiten von Aminomonomer, Vernetzer und Vinylmonomer in hervorragender Weise zur Isolierung von Nucleinsäuren geeignet sind.

10

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die nachfolgenden Schritte

15

A) Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen, im basischen und neutralen Bereich nicht ionischen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,

B) Abtrennen des wasserunlöslichen Polymerisates und

20

C) Vermischen des wasserunlöslichen Polymerisates mit einer wäßrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,

25

dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm ist und aus polymerisierten Einheiten von

a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer

b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und

30

c) 0 bis 93 Gew.-% Vinylmonomer



besteht.

Gegebenenfalls erfolgt in einem Zwischenschritt nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologischen Materials.

5

Bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die Schritte

10

A) Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen, im basischen und neutralen Bereich nicht ionischen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,

B) Abtrennen des wasserunlöslichen Polymerisates und

15

C) Vermischen des wasserunlöslichen Polymerisates mit einer wäßrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,

20

dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g ist und aus polymerisierten Einheiten von

25

- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
- c) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

besteht, oder daß das wasserunlösliche Polymerisat aus

30

in Wasser gut quellbarem Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, das aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

5 besteht.

Insbesondere bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die oben definierten Schritte A), B) und C), dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein  
10 makroporöses Perlpolymerisat mit einer Teilchengröße von 3 bis 100 µm ist, einen Porendurchmesser im Bereich von 10 bis 1 000 nm aufweist, die spezifische Oberfläche bestimmt nach BET 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g (ganz besonders bevorzugt 20 bis 200 m<sup>2</sup>/g) aufweist und aus polymerisierten Einheiten von

- 15 a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer
- c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

besteht, oder daß das wasserunlösliche Polymerisat aus

20

in Wasser gut quellbarem Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, das aus polymerisierten Einheiten aus

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- 25 b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

besteht.

30 Das erfindungsgemäße Verfahren ist zur Isolierung und oder Reinigung von Nucleinsäuren unterschiedlicher Herkunft, beispielsweise aus Zellen, Gewebematerialien, Blut oder Infektionserregern geeignet. Vor der Isolierung der Nucleinsäuren wird das

zu untersuchende Material durch an sich bekannte Techniken, wie z.B. Aufschluß durch Proteaseverdau aufgeschlossen, wobei eine für die weiteren Schritte A bis C geeignete Probe, ein Lysat, erhalten wird. Gegebenenfalls erfolgt in einem Zwischenschritt nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologischen Materials.  
5 Weitere geeignete Aufschlußverfahren sind in DE-A-4 333 805 beschrieben worden.

Es erfolgt das Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, vorzugsweise im Bereich von 2 - 6, besonders bevorzugt im Bereich von 2 - 3 bei Raumtemperatur. Das Abtrennen des wasserun-  
10 löslichen Polymerisates erfolgt durch z.B. Filtration oder Zentrifugation. Der so gewonnene Komplex aus Nucleinsäure und Polymerisat kann nun durch Waschen mit geeigneten Puffern wie z.B. TE gereinigt werden.

Zur Freisetzung der gebundenen Nucleinsäuren aus dem Komplex erfolgt nun die  
15 pH-Einstellung des Komplexes auf pH-Werte oberhalb von 7, vorzugsweise von 8 - 14, besonders bevorzugt im Bereich 12 - 14.

Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate liefern höhere Adsorptions- und Wieder-  
freisetzungsraten als die löslichen Polymerisate gemäß EP-A-0 707 077. Die  
20 Isolierung läßt sich leichter, d.h. mit weniger Arbeitsschritten und in kürzeren Zeiten durchführen. Die Reinheit der isolierten Nucleinsäuren ist höher, insbesondere erhalten sie weniger inhibierende Nebenprodukte, so daß eine Verstärkung der Nucleinsäuren, beispielsweise durch die sogenannte "PCR-Reaktion" und die "RT-PCR" besonders gut gelingt. Auch in Bezug auf Verdau der gewonnenen  
25 Nucleinsäuren mittels Restriktionsenzymen ist das erfindungsgemäße Verfahren der in der EP-A-0 707 077 beschriebenen Methode überlegen.

Weiterhin Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die makroporösen Perlpoly-  
merisate, dadurch gekennzeichnet, daß diese eine mittlere Teilchengröße von 3 bis  
30 100 µm, einen Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und eine spezifische Ober-

fläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g aufweisen und aus polymerisierten Einheiten von

- 5
- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
  - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

bestehen, sowie

- 10
- die in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisate, dadurch gekennzeichnet, daß diese eine mittlere Teilchengröße von 3 bis 100 µm aufweisen und aus polymerisierten Einheiten von

- 15
- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
  - c1) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

bestehen.

- 20
- Weiterhin Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung wasserunlöslicher, makroporöser Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, einem Porendurchmesser von 10 bis 1000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von

- 25
- a) 5 bis 98 Gew.-Teilen Aminomonomer
  - b) 2 bis 30 Gew.-Teilen Vernetzer
  - c1) 0 bis 93 Gew.-Teilen hydrophobem Vinylmonomer
  - d) 10 - 150 Gew.-Teilen Porogen und
  - 30 e) 0,1 - 2,5 Gew.-Teilen Radikalbildner

in einem wäßrigem Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Porogen durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt,

5

sowie ein Verfahren zur Herstellung von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perl-polymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von

- 10 a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer  
b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und  
c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer  
d) 10-150 Gew-Teilen Lösungsmittel und  
e) 0,1 - 2,5 Gew-Teilen Radikalbildner

15

in einem wäßrigem Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Lösungsmittel durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt.

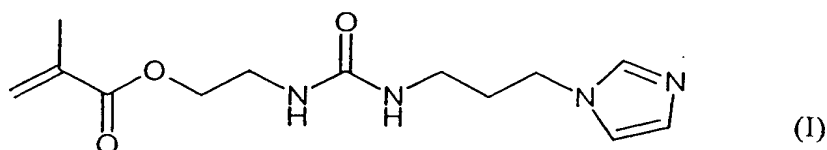
20

Aminomonomere (a) im Sinne der Erfindung sind polymerisierbare, ethylenisch ungesättigte Verbindungen mit mindestens einer primären, sekundären oder tertiären Aminogruppe. Die sekundäre oder tertiäre Aminogruppe kann dabei auch Teil eines cycloaliphatischen oder aromatischen Ringes sein. Beispielhaft seien genannt N-Vinylimidazol, N-Vinylbenzimidazol, 2-Vinylpyridin und 4-Vinylpyridin. Gut geeignete Aminomonomere sind auch die Derivate der Acrylsäure und Methacrylsäure, wie beispielsweise 2-Aminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminopropylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylacrylat, N-tert.-Butylaminopropylmethacrylat, N-(3-Aminopropyl)methacrylamid, N-(3-Imidazolpropyl)methacrylamid, N-(2-Imidazoylethyl)methacrylamid, N-(3-Aminopropyl)-acrylamid, N-(3-Imidazolpropyl)acrylamid, N-(2-Imidazoylethyl)acrylamid, N-(1,1-

30

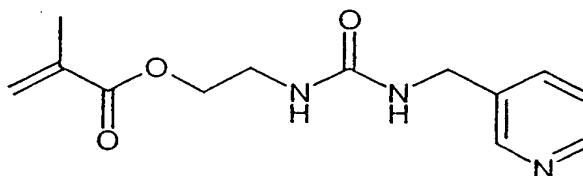
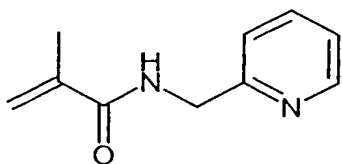
Dimethyl-3-imidazolylpropyl)methacrylamid, N-(1,1-Dimethyl-3-imidazolylpropyl)-acrylamid, N-(3-Benzimidazolylpropyl)methacrylamid und (3-Benzimidazolylpropyl)-acrylamid.

- 5 Gut geeignete Aminomonomere sind auch die Umsetzungsprodukte von Isocyanatoethyl(meth)acrylat und Imidazolylalkylaminen, wie beispielsweise das im Rahmen der vorliegenden Erfindung neue Aminomonomer gemäß Formel (I)



10

Weitere geeignete Aminomonomere gemäß der vorliegenden Erfindung sind die Pyridinderivate der Formeln (II) und (III)



15

Auch Derivate von Styrol und  $\alpha$ -Methylstyrol mit Aminogruppen sind gut geeignet. Beispielfhaft seien genannt: 4-N,N-Dimethylaminostyrol, 2-N,N-Dimethylaminostyrol, 4-N,N-Diethylaminostyrol und 4-N,N-Bis(2-hydroethyl)aminostyrol.

20

Gemäß der vorliegenden Erfindung geeignete Vernetzer (b) sind: Ethylenglycoldimethacrylat, Butandioldimethacrylat, Hexandioldimethacrylat, Pentaerytritoldimethacrylat, 1,2-Glycerindimethacrylat, 1,3-Glycerindimethacrylat, Triethylenglycoldimethacrylat, Tetraethylenglycoldimethacrylat, Trimethylolpropantrimethacrylat, Pentaerytritoldimethacrylat, Pentaerytritoltetramethacrylat, Ethylenglycoldiacrylat, Butandioldiacrylat, Pentaerytritoldiacrylat, 1,3-Glycerindiacrylat, Triethylenglycol-

25

diacrylat, Trimethylolpropantriacyrat, Pentaerythritoltriacyrat, Pentaerythritoltetraacyrat, Allylmethacrylat, Allylacrylat, Methylen-N,N'-bisacrylamid, p-Divinylbenzol und m-Divinylbenzol.

5 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete hydrophobe Vinylmonomere (c1), die in dem erfindungsgemäßen Perlpolymerisat enthalten sein können, sind Acrylsäure-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkylester, Methacrylsäure-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkylester, wie beispielsweise Methylmethacrylat oder Butylacrylat, Acrylnitril, Methacrylnitril, Vinylchlorid, Vinylidenchlorid, Vinylacetat und aromatische Vinylmonomere, wie z.B. Styrol,  
10 Vinylnaphthalin, Vinyltoluol, Ethylstyrol,  $\alpha$ -Methylstyrol, Chlorstyrole und Vinylbenzylchlorid.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete hydrophile Vinylmonomere (c2) sind beispielsweise: 2-Hydroxyethylmethacrylat, 2-Hydroxypropylmethacrylat, 2-Hydroxyethylacrylat, 2-Hydroxypropylacrylat, Triethylenglycolmonomethacrylat,  
15 Tetraethylenglycolmonomethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid und N,N-Dimethylacrylamid.

Für das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von wasserunlöslichen makroporösen Perlpolymerisaten werden Porogene eingesetzt. Hierfür sind flüssige mit  
20 Wasser nicht mischbare Verbindungen, die die eingesetzten Monomere lösen und das gebildete Polymer ausfällen, geeignet. Beispielhaft seien genannt aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Hexan, Heptan, Octan, Isooctan, Isododekan und Alkohole wie Octanol. Das Porogen wird in Mengen von 10 bis 150 Gew.-%, vorzugsweise von 20  
25 bis 100 Gew% bezogen auf die Summe der eingesetzten Monomere und Vernetzer eingesetzt.

Geeignete Radikalbildner im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise unlösliche Initiatoren. Beispielhaft seien genannt: Peroxyverbindungen wie Dibenzoylperoxid, Dilaurylperoxid, Bis (p-chlorbenzoylperoxid), Dicyclohexylperoxydicarbonat, tert.-Butylperoctoat, 2,5-Bis(2-ethylhexanoylperoxy)-2,5-dimethylhexan  
30

und tert.-Amylperoxy-2-ethylhexan, desweiteren Azoverbindungen wie 2,2'-Azobis(isobutyronitril), 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 2,2'-Azobis(2-methylisobutyronitril). Die Initiatoren werden im allgemeinen in Mengen von 0,05 bis 2,5 Gew.-%, vorzugsweise 0,2 bis 1,5 Gew.% bezogen auf die Monomermischung angewendet.

Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen gelförmigen und makroporösen Perlpolymerisate werden gegebenenfalls Schutzkolloide in der wäßrigen Phase eingesetzt. Geeignete Schutzkolloide gemäß der vorliegenden Erfindung sind natürliche und synthetische wasserlösliche Polymere, wie beispielsweise Gelatine, Stärke, Cellulosederivate, insbesondere Celluloseester und Celluloseether, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylsäure, Polymethacrylsäure und Copolymerisate aus Acrylsäure, Methacrylsäure, Methacrylsäureestern und/oder Acrylsäureestern. Besonders gut geeignet sind mit Alkalihydroxid neutralisierte Copolymerisate aus Methacrylsäure und Methacrylsäureester. Die Einsatzmenge der Schutzkolloide beträgt im allgemeinen 0.05 bis 2 % bezogen auf die wäßrige Phase, vorzugsweise 0.1 bis 1 %.

Die wäßrige Phase kann darüberhinaus gegebenenfalls ein Puffersystem enthalten. Bevorzugt werden Puffersysteme, die den pH-Wert der wäßrigen Phase bei Beginn der Polymerisation auf einen Wert zwischen 12 und 5, vorzugsweise zwischen 10 und 6 einstellen. Unter diesen Bedingungen liegen Dispergiermittel mit Carbonsäuregruppen ganz oder teilweise als Salze vor. Auf diese Weise wird die Wirkung der Schutzkolloide günstig beeinflusst. Besonders gut geeignete Puffersysteme enthalten Phosphat- oder Boratsalze.

Die Menge der Wasserphase beträgt im allgemeinen 75 bis 1200 Gew.-%, vorzugsweise 100 bis 500 Gew.-% bezogen auf die Summe aus Monomeren, Vernetzer und Porogen.



Die Rührgeschwindigkeit bei der Polymerisation ist wichtig für die Einstellung der Teilchengröße. Beim erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren nimmt die Größe der erhaltenen Perlpolymerisate mit zunehmender Rührerdrehzahl ab. Die exakte Rührdrehzahl zur Einstellung einer bestimmten vorgegebenen Perlgröße hängt im  
5 Einzelfall stark von der Reaktorgröße, der Reaktorgeometrie und der Rührergeometrie ab. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die notwendige Rührdrehzahl experimentell zu ermitteln. Für Laborreaktoren mit 3-Liter-Reaktionsvolumen, die mit Blattrühren ausgestattet sind, werden bei Verwendung von Copolymerisaten aus Acrylsäure, Methacrylsäure, Acrylsäureestern und/oder Methacrylsäureestern als  
10 Dispergiermittel im allgemeinen Perlgrößen von 6 bis 30  $\mu\text{m}$  bei Drehzahlen von 300 bis 500 Upm erreicht.

Die Polymerisationstemperatur des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens richtet sich nach der Zerfallstemperatur des eingesetzten Initiators. Sie liegt im allgemei-  
15 nen zwischen 50 und 150°C, vorzugsweise zwischen 55 und 100°C. Die Polymerisation dauert 0.5 bis einige Stunden. Es hat sich bewährt, ein Temperaturprogramm anzuwenden, bei dem die Polymerisation bei niedriger Temperatur, beispielsweise 70°C begonnen wird und mit fortschreitendem Polymerisationsumsatz die Reaktionstemperatur erhöht wird.

20 Nach der Polymerisation kann das Polymerisat mit üblichen Methoden, beispielsweise durch Filtrieren oder Dekantieren, isoliert und gegebenenfalls nach ein oder mehreren Wäschen getrocknet werden. Das Porogen kann während der Trocknung entfernt werden. Bei niedrig siedenden Porogenen, wie beispielsweise Hexan ist es  
25 auch möglich, das Porogen aus dem wäßrigen Reaktionsgemisch vor dem Isolieren des Perlpolymerisates ganz oder teilweise durch Destillation abzutrennen.

Die Herstellung der in Wasser quellbaren Perlpolymerisate erfolgt analog der Herstellung der makroporösen Perlpolymerisate, wobei anstelle der hydrophoben Vinyl-  
30 monomere (c1) hydrophile Vinylmonomere (c2) und anstelle des Porogens ein Lösungsmittel eingesetzt wird.

Geeignete Lösungsmittel sind solche, die mit Wasser nicht mischbar sind, die Monomeren und den Vernetzer lösen und das gebildete Polymerisat nicht ausfällen sondern lösen bzw. quellen. Geeignete Lösemittel sind Toluol, Xylol, Tetrachlor-  
5 methan, Chloroform, Methylenchlorid, Dichlorethan und Ethylacetat. Die Menge an Hilfslösemittel beträgt im allgemeinen 10 bis 200 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 150 Gew.-%, besonders bevorzugt 20 bis 100 Gew.-% bezogen auf die Summe aus Monomeren und Vernetzer. Sofern gewünscht kann das Hilfslösemittel nach der Polymerisation beispielsweise durch Destillation abgetrennt werden. Toluol läßt sich  
10 besonders einfach durch azeotrope Destillation entfernen.

Die erfindungsgemäßen in Wasser quellbaren Perlpolymerisate haben Quellungs-  
indices von 1,2 bis 12, vorzugsweise 1,5 bis 8 gemessen bei 25°C und pH 7. Als  
15 Quellungsindex ist der Quotient aus dem Volumen des bis zur Sättigung in Wasser gequollenen Perlpolymerisates und dem Volumen des wasserfreien Perlpolymerisates definiert.

Weiterhin Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind Mittel zur Isolierung von  
Nucleinsäuren enthaltend wasserunlösliche makroporöse Perlpolymerisate mit einer  
20 mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, einen Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g, bestehend aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- 25 b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer
- c) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

oder von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren  
Teilchengröße von 3 bis 100 µm, bestehend aus polymensierten Einheiten von

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer.

5 Diese Mittel liegen vorzugsweise als wässrige Dispersionen mit einem Feststoffgehalt von 0,1 - 50 %, besonders bevorzugt 1 - 10 % vor. Die wässrige Phase kann gegebenenfalls Puffer enthalten, die vorzugsweise im Bereich von 2 - 6 wirksam sind.

10 Mögliche Einsatzgebiete eines beispielsweise als Testkit formulierten Mittels sind die oben bereits genannten Anwendungsbeispiele, beispielsweise bei der Isolierung von Nucleinsäuren aus Zellen, Gewebematerialien, Blut oder Infektionserregern, wobei besonders alle Fragen der Diagnostik eine Rolle spielen. Als Testkit werden auch die beschriebenen Polymerisate für Routine-Nucleinsäuretests in Mikrotiterplatten und/oder Teströhrchen verstanden oder anderen Formaten wie z.B. im Rahmen der

15 Chiptechnologie.

## Beispiele

### Beispiel 1

#### 5 Herstellung des Aminomonomers der Formel 1

Zu einer gerührten Lösung aus 50,07 g (0,4 Mol) 3-Aminopropylimidazol, 140 mg 2,6-Di-tert.butyl-4-methylphenol (Stabilisator), 140 mg Dibutylzinndilaurat (Katalysator) in 250 ml Chloroform wurden bei 20°C unter Kühlung 62,08 g (0,4 Mol) 2-  
10 Isocyanatoethylmethacrylat innerhalb von 60 Min zugetropft. Anschließend wurde der Ansatz solange auf 50°C erhitzt (ca. 5 h) bis im IR-Spektrum keine NCO-Bande nachweisbar war. Man erhielt 112g Aminomonomer der Formel (I).

### Beispiel 2

15

#### Herstellung eines gelförmigen Perlpolymerisates

In einem 250ml-Reaktionsgefäß mit Blattrührer, Rückflußkühler, Thermometer, Gaseinlaß- und Gasauslaßrohr wurde eine Lösung aus 5g Polyvinylalkohol  
20 (Mowiol® 40-88) und 1,5 g Dinatriumhydrogenphosphat in 130 ml entionisiertem Wasser vorgelegt. Zu dieser wäßrigen Lösung wurde bei 20°C unter Rühren mit 450 Upm eine organische Lösung aus 7,91 g N,N-Dimethylamino-ethylmethacrylat, 7g 2-Hydroxyethyl-methacrylat, 0,17g Triethylenglycoldimethacrylat, 0,225 g 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 37,5 g Chloroform innerhalb von 15 min  
25 zugegeben. Es wurde leicht mit Stickstoff gespült und die Temperatur auf 67°C erhöht und 20 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Nach dem Abkühlen wurde das gebildete Perlpolymerisat durch Dekantieren von der Reaktionsflotte abgetrennt und im Vakuum bei 50°C von Chloroform befreit. Man erhielt 13,5 g Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 20 µm und einem Quellungsindex von 5,1  
30 gemessen bei 25 °C in Wasser.

### Beispiel 3

#### Herstellung eines makroporösen Perlpolymerisates

5 In einem 2 Liter-Reaktionsgefäß mit Blattrührer, Rückflußkühler, Thermometer, Gaseinlaß- und Gasauslaßrohr wurde eine Lösung aus 42,5g Polyvinylalkohol (Moviol 40-88) und 12,75 g Dinatriumhydrogenphosphat in 1240 g entionisiertem Wasser vorgelegt. Zu dieser wäßrigen Lösung wurde bei 20°C unter Rühren mit 280 Upm (Umdrehungen pro Minute) eine organische Lösung aus 23,71 g N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, 13,04 g Styrol, 10,67 g Divinylbenzol, 0,71g 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 31,62 g Hexan innerhalb von 30 min bei 25 °C zugegeben. Es wurde leicht mit Stickstoff gespült und die Temperatur auf 66°C erhöht und 20 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Danach wurde bei einer Innentemperatur von 70 bis 98 °C das Hexan abdestilliert. Nach dem Abkühlen wurde das entstandene Perlpolymerisat durch Dekantieren von der Reaktionsflotte abgetrennt und im Vakuum bei 50°C getrocknet. Man erhielt 38 g Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 15 µm und einer spezifischen Oberfläche von 62,3 m<sup>2</sup>/g.

### 20 Beispiel 4

#### Herstellung eines makroporösen Perlpolymerisates

25 Beispiel 3 wurde wiederholt, wobei eine organische Lösung aus 23,71 g Aminomonomer aus Beispiel 1, 13,04 g Styrol, 10,67 g Divinylbenzol, 0,71g 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 38 g Hexan eingesetzt wurde. Man erhielt 35 g makroporöses Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 25 µm und einer spezifischen Oberfläche von 74 m<sup>2</sup>/g.

Biologisches Ergebnis

- 100 µl Blut wurden mit  $10^5$  Caski Zellen gemischt. Diese Zellen enthalten das humane Papillomvirus Typ 16 (HPV).
- 5 ◦ Zu diesem Gemisch wurden 10 µl einer 2,4 %-igen Partikeldispersion aus Beispiel 2 hinzugegeben.
- Nach Zugabe von 200 µl eines geeigneten Puffers, beispielsweise TE, erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur (TE steht für 10 mMol Tris HCl und 1 mMol Ethylendiamintetraessigsäure pH 7.4 in der Endkonzentration).
- 10 ◦ Die Partikel wurden danach bei 7 000 rpm für 3 min in einer Eppendorffzentrifuge sedimentiert.
- Zum Sediment wurden nun 200 µl eines geeigneten Lysispuffers, beispielsweise 0,5 % IGEPAL CA-630® in TE (IGEPAL CA-630® ist ein nicht-ionisches Detergens, was beispielsweise durch die Firma Sigma, Bestellnummer I 3021 bezogen werden kann), gegeben und erneut für 5 min bei
- 15 Raumtemperatur inkubiert.  
Statt IGEPAL CA-630® können aber auch andere Lysispuffer eingesetzt werden. Beispielhaft seien hier klassische Verfahren wie mit Protease K Verdau und anschließende Reinigung mittels Phenol/Chloroform oder
- 20 Natriumlaurylsulfat-Lösungen genannt (Sigma Bestellnummer: L 6026), beispielsweise als 0,5 %ige wässrige Lösung.
- Es erfolgte die erneute Zentrifugation und Sedimentation bei 7 000 rpm für 3 min in einer Eppendorffzentrifuge.
- 25 ◦ Die Partikel wurden anschließend 2 x mit einem geeigneten Puffer (z.B. TE) gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und nur noch mit den Partikeln weitergearbeitet.
- Die Freisetzung der an die Partikel gebundenen Nukleinsäure erfolgte durch Einstellung des pH-Wertes auf >12 durch Zugabe von 1 µl 0,5 normaler
- 30 NaOH.
- Es schloß sich eine 15minütige Inkubation bei Raumtemperatur an.

- Nach Zentrifugation (3 min, 7 000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge) wurde die Konzentration der gewonnenen Nukleinsäure mittels eines geeigneten Verfahrens, beispielsweise durch Analyse in einem Gelsystem, besonders bevorzugt das "Submerged Gel Nucleic Acid Electrophoresis System", Best.-Nr. 170 4406 der Firma BIO-RAD (webpage: [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)), bestimmt.

Im Vergleich zu Beads für die Nukleinsäureextraktion, wie sie aus dem Verfahren der EP-A-0 707 077 bekannt waren, wurden mit den erfindungsgemäßen Verfahren und den darin verwendeten Perlpolymerisaten überraschend deutlich bessere Resultate erzielt.

- 15 µl des so gewonnenen Überstandes wurden nun in eine HPV spezifische PCR (Polymerasekettenreaktion) eingesetzt, das heißt, dass Primer in eine PCR eingesetzt wurde, die spezifisch für humane Papillomviren (HPV) sind. Bei der Analyse des Ergebnisses auf einem Gelsystem konnte die erwartete Nukleinsäurebande klar und deutlich identifiziert werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe umfassend die nachfolgenden Schritte
- 5
- A) Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen, im basischen und neutralen Bereich nicht ionischen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,
- 10
- B) Abtrennen des wasserunlöslichen Polymerisates,
- C) Vermischen des wasserunlöslichen Polymerisates mit einer wäßrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,
- 15
- dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm ist und aus polymerisierten Einheiten von
- 20
- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer  
b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und  
c) 0 bis 93 Gew.-% Vinylmonomer
- besteht.
- 25
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologischen Materials erfolgt.
3. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren umfassend die Schritte A), B) und C) gemäß der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymerisat ein wasserlösliches, makroporöses Perlpolymerisat mit einer mittleren
- 30



Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$  und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500  $\text{m}^2/\text{g}$  ist und aus polymerisierten Einheiten von

- 5
- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
  - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

besteht, oder daß das wasserunlösliche Polymerisat aus

- 10
- in Wasser gut quellbarem Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , das aus polymerisierten Einheiten von

- 15
- a) 5 bis 79,5 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
  - c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

besteht.

- 20
4. Wasserunlösliche, makroporöse Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500  $\text{m}^2/\text{g}$ , dadurch gekennzeichnet, daß diese aus polymerisierten Einheiten von

- 25
- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
  - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

bestehen.

5. Wasserunlösliche aber in Wasser quellbare Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , dadurch gekennzeichnet, daß diese aus polymerisierten Einheiten von

- 5           a)     5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer  
          b)     0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und  
          c2)    10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

bestehen.

10

6. Verfahren zur Herstellung von wasserunlöslichen, makroporösen Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500  $\text{m}^2/\text{g}$ , dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von

15

- a)     5 bis 98 Gew-Teilen Aminomonomer  
b)     2 bis 30 Gew-Teilen Vernetzer  
c1)    0 bis 93 Gew-Teilen hydrophobem Vinylmonomer  
20       d)     10-150 Gew-Teilen Porogen und  
          e)     0,1 - 2,5 Gew-Teilen Radikalbildner

20

in einem wäßrigen Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zersetzungstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Porogen durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt.

25

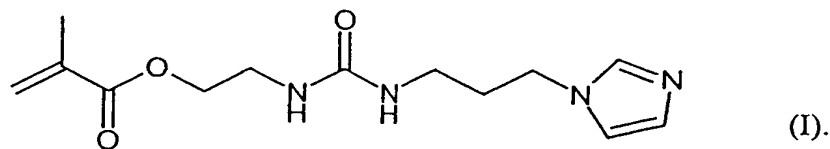
7. Verfahren zur Herstellung von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von

30

- a) 5 bis 79,7 Gew% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew% hydrophilem Vinylmonomer
- d) 10-150 Gew-Teilen Lösungsmittel und
- e) 0,1 - 2,5 Gew-Teilen Radikalbildner

in einem wäßrigen Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Lösungsmittel durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt.

8. Aminomonomer gemäß Formel (I)



9. Verfahren zur Herstellung von Aminomonomer der Formel (I) gemäß Anspruch 8 dadurch gekennzeichnet, daß man 2-Isocyanatoethylmethacrylat mit 3-Aminopropylimidazol umsetzt.

10. Verwendung von wasserunlöslichen, makroporösen Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500  $\text{m}^2/\text{g}$ , bestehend aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer
- c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

oder von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, bestehend aus polymerisierten Einheiten von

- 5
- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
  - c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe.

10

11. Mittel zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe enthaltend wasser-unlösliche makroporöse Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g, bestehend aus polymerisierten Einheiten von

15

- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer
- c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

20

oder von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, bestehend aus polymerisierten Einheiten von

25

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
24. August 2000 (24.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 00/49031 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation: C07H 21/00,  
C08J 9/20, C08F 20/36, 220/36, C07D 233/48, C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01028

(22) Internationales Anmeldedatum:  
9. Februar 2000 (09.02.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 07 023.7 19. Februar 1999 (19.02.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
D-51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PODSZUN, Wolfgang  
[DE/DE]; Roggendorfstrasse 55, D-51061 Köln (DE).  
NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Olefstrasse 11, D-50937  
Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasis-  
ches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts:

12. April 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUCLEINSÄUREN

(57) Abstract: Nucleic acids can be efficiently adsorbed on specific water-insoluble pearl polymers with an average size of 3 to 100  $\mu\text{m}$ , at a neutral or acidic pH value. The acids can then be liberated at an alkaline pH with high yields.

(57) Zusammenfassung: Nucleinsäuren können bei neutralem und saurem pH-Wert an speziellen wasserunlöslichen Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$  effizient adsorbiert werden und bei basischen pH-Werten in hoher Ausbeute wieder freigesetzt werden.

WO 00/49031 A3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01028

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07H21/00 C08J9/20 C08F20/36 C08F220/36 C07D233/48  
C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07H C07D C08J C08F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | WO 97 34909 A (BIO MERIEUX ;CROS PHILIPPE (FR); RODRIGUE MARC (FR); MABILAT CLAUD)<br>25 September 1997 (1997-09-25)<br>cited in the application<br>table I<br>claims 1,12-14,18<br>--- | 1,4-7,<br>10,11       |
| A          | US 4 839 231 A (VANDEKERCKHOVE JOEL S)<br>13 June 1989 (1989-06-13)<br>cited in the application<br>claims<br>---  | 1,4-7,<br>10,11       |
| A          | WO 91 05606 A (MACHEREY NAGEL & CO CHEM)<br>2 May 1991 (1991-05-02)<br>cited in the application<br>claims<br>---  | 1,4-7,<br>10,11       |
|            | ---<br>-/--   |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 November 2000

Date of mailing of the international search report

15/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epord,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Held, P

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: 1st Application No  
PCT/EP 00/01028

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | WO 97 08547 A (SU XING ;THEOBALD SMITH<br>RESEARCH INST I (US))<br>6 March 1997 (1997-03-06)<br>cited in the application<br>page 3, line 17 -page 4, line 14<br>claim 1 | 1,11                  |
| A          | EP 0 572 115 A (ROHM AND HAAS COMPANY)<br>1 December 1993 (1993-12-01)<br>claims  | 6                     |

11/13/2013 PAGE BLANK (USPTO)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01028

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|---------------------|---|--|
| WO 9734909 A                              | 25-09-1997          | CA 2222192 A<br>EP 0842184 A<br>JP 11505426 T   | 25-09-1997<br>20-05-1998<br>21-05-1999   |
| US 4839231 A                              | 13-06-1989          | FR 2586689 A<br>FR 2588006 A<br>EP 0214909 A<br>JP 62059861 A   | 06-03-1987<br>03-04-1987<br>18-03-1987<br>16-03-1987   |
| WO 9105606 A                              | 02-05-1991          | DE 3935098 A<br>DE 59003170 D<br>EP 0496822 A<br>JP 5502940 T   | 25-04-1991<br>25-11-1993<br>05-08-1992<br>20-05-1993   |
| WO 9708547 A                              | 06-03-1997          | US 5804684 A<br>AU 6857596 A  | 08-09-1998<br>19-03-1997   |
| EP 0572115 A                              | 01-12-1993          | AT 163657 T<br>AU 3710093 A<br>BR 9302022 A<br>CA 2096492 A<br>CN 1079229 A, B<br>CZ 9301023 A<br>DE 69317154 D<br>DE 69317154 T<br>HU 66373 A, B<br>JP 6049139 A<br>MX 9302873 A<br>NO 931883 A<br>NZ 247458 A<br>SK 52493 A<br>US 5539071 A<br>US 5639861 A<br>ZA 9303060 A | 15-03-1998<br>02-12-1993<br>07-12-1993<br>30-11-1993<br>08-12-1993<br>15-12-1993<br>09-04-1998<br>12-11-1998<br>28-11-1994<br>22-02-1994<br>01-11-1993<br>30-11-1993<br>27-09-1994<br>08-12-1993<br>23-07-1996<br>17-06-1997<br>29-11-1993 |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01028

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07H21/00 C08J9/20 C08F20/36 C08F220/36 C07D233/48  
C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C07H C07D C08J C08F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A          | WO 97 34909 A (BIO MERIEUX ;CROS PHILIPPE (FR); RODRIGUE MARC (FR); MABILAT CLAUD)<br>25. September 1997 (1997-09-25)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Tabelle I<br>Ansprüche 1,12-14,18<br>--- | 1,4-7,<br>10,11    |
| A          | US 4 839 231 A (VANDEKERCKHOVE JOEL S)<br>13. Juni 1989 (1989-06-13)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Ansprüche<br>---  | 1,4-7,<br>10,11    |
| A          | WO 91 05606 A (MACHEREY NAGEL & CO CHEM)<br>2. Mai 1991 (1991-05-02)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Ansprüche<br>---  | 1,4-7,<br>10,11    |
|            | ---   |                    |
|            | ---/---   |                    |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. November 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Held, P

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/01028

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A          | WO 97 08547 A (SU XING ;THEOBALD SMITH<br>RESEARCH INST I (US))<br>6. März 1997 (1997-03-06)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 3, Zeile 17 -Seite 4, Zeile 14<br>Anspruch 1 | 1,11               |
| A          | EP 0 572 115 A (ROHM AND HAAS COMPANY)<br>1. Dezember 1993 (1993-12-01)<br>Ansprüche   | 6                  |

THIS PAGE BLANK (USPTO)



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung... die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01028

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie   | Datum der<br>Veröffentlichung  |
|--|-------------------------------|---|--|
| WO 9734909 A                                       | 25-09-1997                    | CA 2222192 A<br>EP 0842184 A<br>JP 11505426 T   | 25-09-1997<br>20-05-1998<br>21-05-1999   |
| US 4839231 A                                       | 13-06-1989                    | FR 2586689 A<br>FR 2588006 A<br>EP 0214909 A<br>JP 62059861 A   | 06-03-1987<br>03-04-1987<br>18-03-1987<br>16-03-1987   |
| WO 9105606 A                                       | 02-05-1991                    | DE 3935098 A<br>DE 59003170 D<br>EP 0496822 A<br>JP 5502940 T   | 25-04-1991<br>25-11-1993<br>05-08-1992<br>20-05-1993   |
| WO 9708547 A                                       | 06-03-1997                    | US 5804684 A<br>AU 6857596 A  | 08-09-1998<br>19-03-1997   |
| EP 0572115 A                                       | 01-12-1993                    | AT 163657 T<br>AU 3710093 A<br>BR 9302022 A<br>CA 2096492 A<br>CN 1079229 A,B<br>CZ 9301023 A<br>DE 69317154 D<br>DE 69317154 T<br>HU 66373 A,B<br>JP 6049139 A<br>MX 9302873 A<br>NO 931883 A<br>NZ 247458 A<br>SK 52493 A<br>US 5539071 A<br>US 5639861 A<br>ZA 9303060 A | 15-03-1998<br>02-12-1993<br>07-12-1993<br>30-11-1993<br>08-12-1993<br>15-12-1993<br>09-04-1998<br>12-11-1998<br>28-11-1994<br>22-02-1994<br>01-11-1993<br>30-11-1993<br>27-09-1994<br>08-12-1993<br>23-07-1996<br>17-06-1997<br>29-11-1993 |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**